

A 6

1/5/3 (Item 3 from file: 351)
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2007 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0000821698

WPI ACC NO: 1975-09319W/197506

Soya bean oil antilipaemic agents - pref. contg. sterols and
tocopherols

Patent Assignee: T S KANEDA (KANE-I)

Inventor: KANEDA T; TABATA T

Patent Family (4 patents, 4 countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date
DE 2334652	A	19750130	DE 2334652	A	19730707
197506 B					
FR 2231394	A	19750131	FR 197319292	A	19730528
197512 NCE					
GB 1427253	A	19760310	GB 197321736	A	19730507
197611 NCE					
US 3993756	A	19761123	US 1973358537	A	19730509
197649 NCE					
			US 1975549047	A	19750211

Priority Applications (no., kind, date): DE 2334652 A 19730707

Alerting Abstract DE A

Antilipaemic agents contain a non-saponifiable soya bean oil
fraction (I)
in an amt. effective in lowering the lipid content of blood sperm.
(I)
perf. contains ca. 45wt. % phytosterols (pref. campesterol,
stigmasterol
and/or B-sitosterol) and ca. 20wt. % tocopherols. The agents pref.
contain
a suitable carrier, (pref. silicic acid anhydride). The new agents
can be
used at < 0.1X the usual dosage B-sitosterol (1.2-1.8g./day), so
that
possible kidney and liver damage can be avoided.

Title Terms/Index Terms/Additional Words: SOY; BEAN; OIL;
ANTILIPAEMIC;
AGENT; PREFER; CONTAIN

Class Codes

International Classification (Main): A61K-027/14

(Additional/Secondary): A61K-031/35, A61K-035/78, A61K-037/78

US Classification, Issued: 424195100

File Segment: CPI

DWPI Class: B04

Manual Codes (CPI/A-M): B01-D02; B03-H; B04-B01C; B12-H03

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(A n'utiliser que pour
le classement et les
commandes de reproduction).

2.231.394

②1 N° d'enregistrement national.

73.19292

(A utiliser pour les paiements d'annuités,
les demandes de copies officielles et toutes
autres correspondances avec l'I.N.P.I.)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

1^{re} PUBLICATION

②2 Date de dépôt 28 mai 1973, à 15 h 3 mn.
④1 Date de la mise à la disposition du
public de la demande..... B.O.P.I. — «Listes» n. 52 du 27-12-1974.

⑤1 Classification internationale (Int. Cl.) A 61 k 27/14.

⑦1 Déposant : KANEDA Takashi et TABATA Toshikazu, résidant au Japon.

⑦3 Titulaire : *Idem* ⑦1

⑦4 Mandataire : Cabinet Plasseraud, Devant, Gutmann, Jacquelin, Lemoine.

⑤4 Agent antilipémique contenant une fraction d'huile de soja.

⑦2 Invention de :

③3 ③2 ③1 Priorité conventionnelle :

L'invention concerne un agent antilipémique contenant une proportion thérapeutiquement efficace d'une fraction non saponifiable ou insaponifiable d'huile de soja. Des agents antilipémiques sont des substances qui abaissent le taux de graisses ou lipides dans le sérum du sang. La portée de l'invention s'étend aussi à une composition thérapeutique administrable par voie orale, ladite composition contenant un support ou véhicule pharmaceutique et une fraction non saponifiable d'huile de soja, utilisable pour le traitement de la lipémie.

Il a été établi dans la technique antérieure que certains stérols provenant de végétaux (aussi dénommés phytostérols), y compris le β -sitostérol et le stigmastérol, sont efficaces pour abaisser le taux de cholestérol dans le sérum du sang (voir, par exemple, l'ouvrage "Steroid Biochemistry and Pharmacology" par M.H. Briggs et J. Brotherton ; Academic Press, London, 1970, page 183). Il a été publié un certain nombre de tels travaux sur l'activité antilipémique de phytostérols. Un agent antilipémique contenant en poids 20 % de β -sitostérol en suspension dans une solution alcoolique à 4 % a été récemment introduite sur le marché par la E. Lilly Co. A l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode connue permettant d'extraire et de séparer, sous une forme pure, à partir d'huiles végétales, des phytostérols autres de la β -sitostérol, par exemple du stigmastérol et du campestérol. L'utilisation de β -sitostérol comme agent antilipémique exige l'administration de fortes doses, c'est-à-dire de 20 à 30 g de β -sitostérol par jour, en raison du faible taux d'absorption du β -sitostérol par le corps (comme l'indiquent Briggs et Brotherton dans leur ouvrage cité ci-dessus) ; c'est là un inconvénient gênant, car, à la suite de longues périodes d'administration, il apparaît des troubles hépatiques et néphrétiques. De plus, lorsque l'agent antilipémique contenant du β -sitostérol est administré pendant une longue période de temps, on observe pendant la période d'administration un phénomène dit de rebond de la valeur du cholestérol.

On a découvert que, lorsqu'on utilise un agent antilipémique composé principalement d'une fraction non saponifiable d'huile de soja, la dose nécessaire peut être abaissée à moins du dixième (de 1,2 à 1,8 g par jour) de celle nécessaire quand on utilise du β -sitostérol ; on évite ainsi tout risques de troubles hépatiques et néphrétiques. Des examens de sang et d'urine

prouvent que l'agent antilipémique nouvellement découvert ne produit pas d'effets secondaires nuisibles même quand il est administré au cours d'une longue période de temps. Il a été en outre confirmé, par des études en laboratoire et des études cliniques, que les phytostérols remplacent une partie des stérols animaux (cholestérols) dans le foie et dans le sang. Il convient d'administrer l'agent contenant la matière non saponifiable d'huile de soja à des doses ne contenant pas plus de 600 à 900 mg de phytostérols pour aboutir à un résultat clinique satisfaisant. On a découvert que lorsque la fraction non saponifiable d'huile de soja est administrée à des doses totales de 1200 à 1800 mg par jour, le taux de cholestérol total dans le sérum du sang se trouve en moyenne abaissé de 10 à 15 %, mais on pense que le véritable abaissement du taux de cholestérol est d'environ 20 à 25 % étant donné qu'environ 10 % des cholestérols du sérum sont remplacés par des phytostérols.

De ce qui précède, il ressort que l'agent antilipémique faisant l'objet de l'invention offre l'avantage de pouvoir être administré à des doses très notablement plus faibles que les doses nécessaires d'agent contenant du β -sitostérol de la technique antérieure dont il faut administrer au total de 20 à 30 g par jour.

Un but essentiel de l'invention est de réaliser un agent antilipémique qui soit efficace pour diminuer les taux de lipides dans le sérum sans provoquer d'effets secondaires indésirables.

L'invention pourra, de toute façon, être bien comprise à l'aide du complément de description qui suit ainsi que des dessins ci-annexés, lesquels complément et dessins concernent différents modes de réalisation de l'invention choisis à titre d'exemples non limitatifs et sont, bien entendu, donnés surtout à titre d'indication.

La fig. 1, de ces dessins, est un diagramme illustrant les variations de la proportion totale de cholestérol (portée en ordonnées) dans le sérum de deux groupes de lapins au cours d'une période de 12 semaines (portée en abscisses) au cours de laquelle les lapins sont nourris de la manière spécifiée dans l'exemple n° 7.

La fig. 2 est une représentation graphique des variations de la proportion totale de cholestérols libres présents dans le

sérum (en ordonnées) en fonction du laps de temps écoulé en semaines (porté en abscisses) pendant l'essai de l'exemple n° 7.

La fig. 3 est une représentation graphique des variations de la proportion de phospholipides dans le sérum (en ordonnées) en fonction du laps de temps écoulé en semaines (en abscisses) pendant l'essai de l'exemple n° 7.

La fig. 4 est une représentation graphique des variations de la proportion de graisse neutre dans le sérum (en ordonnées) en fonction du laps de temps écoulé en semaines (en abscisses) pendant l'essai de l'exemple n° 7.

La fig. 5, enfin, est une représentation graphique des variations de la proportion de lipoprotéines dans le sérum (en ordonnées) en fonction du laps de temps écoulé en semaines (en abscisses) pendant l'essai de l'exemple n° 7.

On décrit ci-après les modes de réalisation préférés de l'invention.

La fraction insaponifiable d'huile de soja qui est utilisée comme composant actif de l'agent antilipémique selon l'invention peut être préparée en saponifiant et en soumettant à une distillation moléculaire une huile de soja désodorisée. La fraction d'huile ainsi produite contient de fortes proportions de phytostérols et de tocophérols. L'analyse de la fraction insaponifiable d'huile de soja par un essai utilisant une réaction colorée, un essai basé sur une réaction de formation de digitonide, les spectres d'absorption dans l'infrarouge (IR) et dans l'ultra-violet (UV), et par chromatographie en couche mince et gaz/liquide, révèle que les substances suivantes sont contenues dans la fraction insaponifiable : phytostérols : β -sitostérol, stigmastérol et campestérol ; tocophérols naturels : α -, β -, et γ -tocophérols ; acides gras : acides laurique, myristique, palmitique et linoléique ; et une petite proportion de squalane.

Diverses théories ont été avancées pour expliquer l'activité physiologique de l' α -tocophérol (vitamine E) qui est un constituant de la fraction insaponifiable d'huile de soja ; une de ces théories est basé sur le concept d'antioxydant biologique. Il a été admis que l' α -tocophérol possède des propriétés antioxydantes en raison du fait que des animaux souffrant d'une déficience de vitamine E ont dans leur corps des composés considérés comme étant des peroxydes de lipides. Selon une autre théorie, la vitamine E participe directement à une réaction enzymatique,

réduisant le cytochrome C en présence d'acides gras non saturés. D'autres intéressantes théories concernant la vitamine E ont été avancées, y compris une théorie selon laquelle la vitamine E est impliquée dans la biosynthèse de l'ubiquinone et dans sa rétention dans le corps. Une autre théorie est qu'un manque de vitamine E provoque une peroxydation d'acides aliphatiques non saturés qui sont contenus dans des membranes vivantes, en modifiant ainsi les caractéristiques de transmission ou de diffusion des membranes.

Comme on l'a indiqué ci-dessus, les tocophérols sont considérés comme exerçant de nombreux effets physiologiques inattendus autres que celui d'un antioxydant et peuvent par conséquent se révéler intéressants à utiliser dans diverses applications comme médicaments. L'action médicinale de la fraction insaponifiable d'huile de soja utilisée selon l'invention apparaît due aux tocophérols présents en fortes proportions dans cette fraction.

La fraction insaponifiable d'huile de soja faisant l'objet de l'invention est un produit obtenu par distillation et condensation d'huile de soja naturelle. Il n'est pas actuellement possible de préparer artificiellement un agent ayant la même composition que le distillat en question.

A l'heure actuelle, il est difficile aussi d'expliquer scientifiquement les raisons de l'activité physiologique des composants contenus dans la fraction d'huile ou de la diminution des effets secondaires indésirables.

Des expériences prouvent qu'une fraction insaponifiable d'huile de soja contenant en poids environ 45 % de phytostérols et environ 20 % de tocophérols est préférable en vue de son utilisation comme agent antilipémique. Par conséquent, la fraction insaponifiable d'huile de soja utilisée dans le produit selon l'invention contient de préférence, en poids, environ 45 % de phytostérols et environ 20 % de tocophérols. La teneur en phytostérols et en tocophérols dépend du type d'huile de soja utilisé.

La fraction insaponifiable d'huile de soja en question peut être préparée en utilisant des acides gras bruts d'huile de soja (distillat désodorisé d'huile de soja) contenant en poids environ 25 % de phytostérols et environ 18 % de tocophérols en soumettant lesdits acides à une estérification avec du méthanol, puis à une distillation moléculaire pour en séparer les acides gras libres,

après quoi on recueille la fraction insaponifiable qui contient en poids environ 45 % de phytostérols et environ 20 % de tocophérols.

La fraction insaponifiable d'huile de soja utilisée selon l'invention est un semi-solide opaque, brun à la température ambiante ordinaire, et devient un liquide huileux, semi-transparent quand on la chauffe jusqu'à une température supérieure à environ 80°C. La fraction insaponifiable a une odeur particulière et une saveur légèrement sucrée.

La fraction insaponifiable d'huile de soja manifeste une solubilité sélective dans divers solvants. Elle est extrêmement soluble dans le chloroforme, facilement soluble dans l'éther, modérément soluble dans l'acétone, difficilement soluble dans l'éthanol et à peu près insoluble dans l'eau. La solubilité de la fraction en question dans ces solvants est comme suit :

<u>Solvant</u>	<u>Solubilité</u>
chloroforme	1 g/0,9 ml
éther	1 g/2,0 ml
acétone	1 g/500 ml
éthanol	1 g/5000 ml
eau	1 g est insoluble dans 10.000 litres d'eau.

Exemple 1. - Stabilité à la température ordinaire.-

On détermine les stabilité à la température, à l'humidité et à la lumière de la fraction insaponifiable d'huile de soja faisant l'objet de l'invention. En ce qui concerne la stabilité à la température, on place une fraction insaponifiable d'huile de soja dans un flacon transparent à large encolure pour médicaments, on ferme le flacon avec un bouchon métallique et on le laisse reposer à la température ambiante ordinaire pendant une période de deux ans. La couleur de la fraction insaponifiable vire du brun au brun jaunâtre, mais on ne constate aucun déplacement du maximum et du minimum des spectres d'absorption dans l'UV, respectivement à 295 nm et à 261 nm, en solution éthanolique. D'autre part, on constate que la teneur en tocophénols n'est diminuée que d'environ 2 % après la première année, et d'environ 10 % après deux ans. Lorsqu'un excipient tel que SiO₂ est granulé ou encapsulé, on ne constate aucune variation de couleur ni de teneur en tocophérols au cours d'une période de temps analogue.

Exemple 2 - Stabilité à l'humidité.-

Pour éprouver la stabilité de la fraction insaponifiable à l'humidité, on granule et on encapsule cette fraction et on place les granules résultants dans neuf récipients différents, le degré d'humidité de l'atmosphère à l'intérieur de chacun de ces récipients étant réglé en utilisant des solutions saturées de différents sels. Après exposition à l'intérieur des récipients pendant 15 jours, on mesure l'hygroscopicité des granules respectifs. Les résultats des essais de stabilité à l'humidité ainsi obtenus sont donnés dans le Tableau I ci-après :

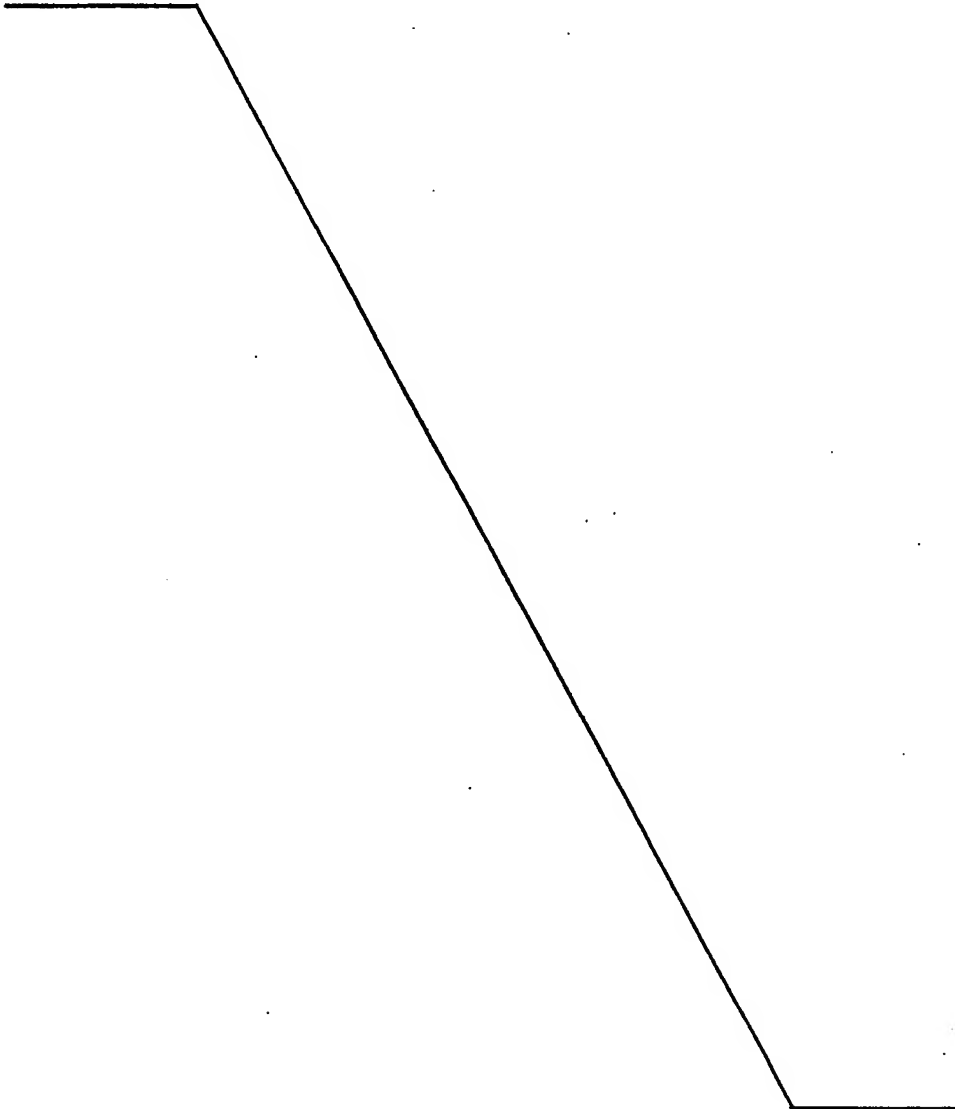


TABLEAU I

Témo in		Humidité Relative (H.R.) % pendant la conservation						
	20,4	40,2	53,7	70,2	79,1	82,3	85,6	90,3 95,5
Hygroscopicité	nulle	nulle	nulle	oui	oui	oui	oui	oui
Couleur	jaune pâle	Jaune pâle	jaune pâle	jaune	jaune	jaune	jaune	jaune foncé

Les solutions saturées de sels utilisées pour les mesures ci-dessus sont les suivantes :

	<u>Sel</u>	<u>Humidité relative (%)</u>
5	CH_3COOK	20,4
	CrO_3	40,2
	$\text{NaBr} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	53,7
	NaNO_3	70,2
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	79,1
10	KCl	82,3
	K_2CrO_4	85,6
	KNO_3	90,3
	K_2SO_4	95,5

Les solutions saturées de sels spécifiés dans la colonne de gauche ci-dessus maintiennent les humidités relatives respectives indiquées dans la colonne de droite quand elles sont conservées dans des flacons fermés à 37°C.

De l'examen du Tableau 1, il ressort que la fraction insaponifiable d'huile de soja encapsulée est stable au-dessous d'une humidité relative d'environ 60 %. Les données indiquent que l'humidité critique pour la stabilité de la fraction insaponifiable d'huile de soja est de 63,1 %.

Exemple 3 - Stabilité à la lumière.

La stabilité à la lumière de la fraction insaponifiable est mesurée, avec et sans encapsulation, en irradiant des échantillons au moyen d'un "fade-mètre" au xénon à basse température avec une quantité de lumière (environ 180 unités Langley, rayonnement ultraviolet de 300 à 400 nm) correspondant à celle de dix jours d'exposition à la lumière solaire directe calculée sur la valeur moyenne d'une année. Pendant cette période d'irradiation, on observe les échantillons pour déterminer les variations de couleur et d'odeur ; on les soumet aussi à une analyse qualitative, à une mesure des spectres d'absorption UV, à une chromatographie en couche mince et à une analyse quantitative. Dans le cas de ceux des échantillons de fraction insaponifiable d'huile de soja qui ne sont pas encapsulés, la couleur vire du brun au brun jaunâtre ; les longueurs d'onde du maximum et du minimum des spectres d'absorption en solution éthanolique, situés respectivement à 295 nm et à 261 nm, ne sont absolument pas déplacées bien que le rapport des spectres d'absorption de lumière ait aug-

menté d'environ 3,5 % après une irradiation pendant cinq jours et d'environ 8,7 % après une irradiation pendant dix jours. La teneur en tocophérols a été diminuée d'environ 6 % après une irradiation pendant cinq jours, et d'environ 10 % après une irradiation pendant dix jours. D'autre part, avec les échantillons encapsulés, le degré de modification est plus petit que celui constaté sur les échantillons non encapsulés : le rapport des spectres d'absorption UV est augmenté de 3,6 % après une irradiation pendant cinq jours et de 5 % après une irradiation pendant dix jours ; la teneur en tocophérols est diminuée de 2 % après une irradiation pendant cinq jours et de 6 % après une irradiation pendant dix jours.

Essais de toxicité.-

Des résultats des essais ci-dessus, il ressort clairement que des agents antilipémiques contenant des proportions thérapeutiquement efficaces de la fraction insaponifiable d'huile de soja doivent être conservés dans l'obscurité. Des expériences prouvent que lorsque la fraction insaponifiable d'huile de soja (aussi bien encapsulée que non encapsulée) est placée dans un récipient hermétiquement clos et protégé contre la lumière, elle conserve son efficacité thérapeutique pendant plus de deux ans.

La toxicité de la fraction insaponifiable d'huile de soja utilisée selon l'invention a été examinée par mise en oeuvre d'un essai de toxicité aiguë, d'un essai de toxicité sub-aiguë et d'un essai de toxicité chronique. Ces essais sont effectués de la manière décrite ci-après.

Exemple 4 - Essai de toxicité aiguë.-

On utilise comme animaux d'expérience un certain nombre de souris (femelles et mâles) pesant de 12 à 18 g et de rats Wistar (femelles et mâles) pesant de 60 à 90 g, tous âgés de 4 semaines et qui ont été élevés au laboratoire pendant une semaine. On prend cinq souris et cinq rats pour constituer chaque groupe d'essais. Une solution, dans de l'huile de sésame, de la fraction insaponifiable d'huile de soja est dosée par tubage stomacal aux animaux de chaque groupe conformément aux prescriptions spécifiées ci-dessous, et chaque groupe d'animaux ainsi traités est maintenu dans une cage d'élevage maintenue à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une humidité relative de $55 \pm 5\%$.

Souris	8,0 g/kg par voie orale
	4,0 g/kg par injection hypodermique

Rat 2,0 g/kg par injection abdominale
 8,0 g/kg par voie orale
 2,0 g/kg par injection hypodermique
 1,0 g/kg par injection abdominale

5 72 heures après l'administration de la dose, on observe les signes de survie des animaux d'expérience et on poursuit les observations pendant les dix jours suivants afin de déterminer la dose létale moyenne (DL_{50}). Les résultats de ces essais sont les suivants :

10 DL_{50} : 72 heures après l'administration de la dose tous les animaux (souris et rats) sont vivants et, même après les dix jours suivants, aucun ne meurt. Il est donc impossible de calculer une valeur de la DL_{50} .

 Symptômes toxiques : on n'observe pas de différence entre
15 les animaux d'essais et les animaux normaux en ce qui concerne le comportement ou les symptômes toxiques.

Exemple 5 - Essai de toxicité sub-aiguë.-

 On utilise comme animaux d'essais un certain nombre de rats mâles Wistar (poids 120 à 160 g) et de rats femelles (poids : 105
20 à 135 g) achetés à l'âge de quatre semaines et élevés ensuite au laboratoire pendant une semaine. On constitue chaque groupe d'essais avec dix rats mâles et dix femelles. La fraction insaponifiable d'huile de soja est mélangée avec une substance alimentaire pulvérisée, et le mélange est dosé pour chacun des groupes
25 selon les indications spécifiées ci-dessous. Les animaux ayant reçu cette dose sont maintenus dans des cages d'élevage à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une humidité relative de $55 \pm 5\%$. Les cages d'élevage sont ventilées dix fois par jour.

 Dose quotidienne administrée : 9000 mg/kg
30 4500 mg/kg
 2250 mg/kg

 Les différentes doses ci-dessus ont été déterminées sur la base des résultats d'expériences préliminaires au cours desquelles des rats avaient reçu des doses de la fraction insaponifiable pen-
35 dant deux semaines. L'agent antilipémique en question est administré par voie orale aux animaux de chaque groupe (mâles et femelles étant encagés séparément) chaque jour aux trois doses différentes sus-spécifiées, en mélangeant l'agent avec une substance alimentaire pulvérisée produite par la Nippon Clare K. K. L'expé-
40 rience d'administration de l'agent est poursuivie pendant un mois,

en pesant périodiquement chaque animal d'essais. Les quantités d'aliments et d'eau prises par chaque animal d'essais sont surveillées aussi, et on observe les animaux pour déceler l'apparition de symptômes toxiques. A la fin d'une période d'essais de
5 deux semaines, on soumet les animaux d'essais à une analyse d'urine (pour déterminer le pH et les taux de protéines et de sucres), à une analyse du sang (détermination du nombre d'hématies, du nombre de leucocytes, du taux d'hémoglobine et de la formule leucocytaire), à une étude patho-morphologique (examen des prin-
10 cipaux organes par dissection et mesure du poids), et à une étude biochimique du sérum (pour la mesure de GOT, GPT, Al-P, Ch-E, LDH, T.Ch, F.Ch, Na⁺, K⁺, Cl⁻, protéines du sérum et sucres du sang).

Les résultats d'essais peuvent se résumer comme suit :

- 15 1) Les symptômes généraux sont les mêmes que ceux des témoins : ni décès, ni symptômes toxiques.
- 2) Pas de variations significatives du poids, ni des quantités d'aliments et d'eau consommées par les animaux de n'importe quel groupe.
- 20 3) Les essais effectués sur le sang ne décèlent pas de différences significatives entre les animaux des groupes d'essais et du groupe témoin.
- 4) L'étude biochimique du sérum du sang de chaque animal d'essais ne révèle pas de différences attribuables à des diffé-
25 rences dans les doses de fraction insaponifiable administrées.
- 5) On ne constate aucun effet défavorable sur le poids des organes ni dans l'étude patho-morphologique.

Exemple 6 - Essai de toxicité chronique.-

On utilise comme animaux d'essais un certain nombre de rats
30 mâles Donryu (pesant de 90 à 130 g) achetés à l'âge de quatre semaines et élevés pendant un laps de temps convenable. On prend dix rats pour chaque groupe. L'agent antilipémique contenant la fraction insaponifiable d'huile de soja est mélangé avec une substance alimentaire pulvérisée, et le mélange est donnée comme
35 nourriture à chacun des animaux d'essais à raison des différentes quantités indiquées ci-dessous. Les rats ainsi nourris sont conservés dans des cages maintenues à une température de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ avec une humidité relative de $55 \pm 5\%$.

Dose quotidienne :	9000 mg/kg
	6000 mg/kg
	3000 mg/kg

Dans un groupe (de dix rats), trois rats reçoivent la dose pendant 13 semaines et sept rats pendant 27 semaines. Pendant la période d'essais, on surveille le poids de la prise de nourriture de chaque rat tout en observant l'apparition de symptômes toxiques. Après la fin des périodes d'essais respectives, on soumet les animaux d'essais à une analyse d'urine (pH, protéines, sucres), à une analyse du sang (nombre d'hématies, nombre de leucocytes, taux d'hémoglobine, formule leucocytaire), à une étude matho-morphologique (examen des principaux organes par dissection et mesure de poids) et à une étude biochimique du sérum (mesure de GOT, GPT, Al-P, Ch-E, LDH, T'CH, F'Ch, Na⁺, K⁺, Cl⁻, protéines du sérum et sucres du sang). Les résultats d'essais sont résumés ci-après.

1) Les symptômes généraux des animaux ayant reçu l'agent antilipémique avec leur alimentation sont les mêmes que ceux des témoins ; on n'observe ni décès, ni symptômes toxiques.

2) On ne constate aucune modification optique ni microscopique dans les systèmes artériels (artères coronaires, rénales, etc.).

3) Dans les reins, on n'observe aucune différence marquée dans les dépôts graisseux, la proportion de glycogène, la genèse des cellules étoilées, ni dans les cellules parenthémales par comparaison avec les animaux témoins.

4) On ne constate pas de modifications dans les fonctions myélopoïétiques.

5) L'examen biochimique ne révèle pas de modifications inhabituelles.

6) On n'observe pas de différences significatives en ce qui concerne le poids, la consommation de nourriture et d'eau, les résultats de l'analyse du sang, le poids des organes examinés.

Des résultats d'essais résumés ci-dessus, il ressort que l'agent antilipémique en question est extrêmement non toxique, de sorte qu'il est possible d'administrer un tel agent pendant une longue période de temps sans risques d'effets nuisibles.

Les effets médicaux de l'agent antilipémique en question ont été déterminés par des essais de laboratoire, aussi bien que des animaux d'expériences que sur des cas cliniques. Plusieurs tels essais sont décrit ci-après.

Exemple 7 - Effets pharmacologiques.-

Méthode d'essais : on utilise un certain nombre de lapins

mâles comme animaux d'essais. On achète les animaux à un poids d'environ 2,0 kg et on les élève pendant environ deux semaines pour leur permettre de s'acclimenter à leurs nouvelles conditions d'existence avant de les utiliser comme animaux d'essais. On utilise treize lapins pour les essais ; on les partage en un groupe témoin et un groupe d'essais. On donne chaque jour aux animaux des deux groupes, à raison de 100 g pour chaque lapin, un aliment solide (produit par la Nippon Clare K. K.) contenant en poids 1 % de cholestérol. Les animaux reçoivent de l'eau ad libitum au moyen d'un appareil automatique de fourniture d'eau. L'agent antilipémique est administré aux animaux du groupe d'essais sous la forme de capsules à raison de 1,7 g par jour pendant 12 semaines ; les animaux du groupe témoin reçoivent, de la même manière, de l'amidon de pomme de terre. Le taux de lipides dans le sérum du sang de tous les animaux est mesuré de la manière décrite ci-dessous en utilisant du sang prélevé dans la veine d'une oreille avant le début de la période d'essais, et ensuite toutes les deux semaines pendant la période d'essais.

Cholestérols totaux : méthode de Zak-Henry modifiée par Kitamura
 cholestérol libre méthode à la digitonine
 graisses neutres méthode de Yamamoto perfectionnée par Van Handel-Kawade
 phospholipides méthode d'Allen modifiée par Nakamura
 lipoprotéines méthode par électrophorèse

25 A) Changement de poids

Les poids des lapins du groupe recevant l'agent en question aussi bien que les lapins du groupe témoin augmentent normalement. A cet égard, on ne constate aucune différence entre les deux groupes.

30 B) Lipides dans le sérum

1) Cholestérol : on constate une remarquable augmentation des cholestérols totaux et du cholestérol libre dans le groupe témoin, tandis que dans le groupe des animaux ayant reçu l'agent antilipémique on n'observe qu'une augmentation relativement petite de ces deux valeurs, correspondant à peu près à la moitié de l'augmentation constatée sur les animaux du groupe témoin. La fig. 1 représente graphiquement les variations de la proportion de cholestérols totaux dans le sérum en fonction du laps de temps écoulé au cours de la période d'essais aussi bien pour les animaux du groupe ayant reçu le médicament que pour les

animaux du groupe témoin. La fig. 2 est une représentation graphique analogue à celle de la fig. 1 ; elle indique les variations du taux de cholestérol libre dans le sérum en fonction du temps en semaines. Dans ces figures, "ST-2" désigne l'agent antilipémique selon l'invention (contenant une fraction insaponifiable d'huile de soja). Les données représentées dans les fig. 1 et 2 prouvent que l'agent antilipémique en question supprime effectivement l'accroissement du taux de cholestérol dans le sérum.

2) Phospholipides : La fig. 3 représente graphiquement les variations du taux des phospholipides dans le sérum en fonction du temps écoulé au cours de la période d'essais aussi bien pour les animaux du groupe ayant reçu le médicament en question que pour les animaux du groupe témoin. Comme le prouve la fig. 3 l'agent antilipémique en question est efficace aussi pour supprimer l'accroissement du taux de phospholipides dans le sérum.

3) Graisses neutres : La fig. 4 représente graphiquement les variations du taux de graisses neutres dans le sérum en fonction du temps écoulé, aussi bien pour les animaux du groupe ayant reçu l'agent en question que pour les animaux du groupe témoin. Comme le prouve la fig. 4, la valeur du taux de graisses neutres pour les animaux traités est légèrement plus élevée que pour les animaux du groupe témoin avant le commencement de l'essai, mais elle devient inférieure à partir de la sixième semaine à partir du début du traitement. Après 12 semaines, la valeur du taux de graisses neutres pour le groupe d'essais est abaissée à la moitié de la valeur trouvée sur le groupe témoin.

4) Lipoprotéines dans le sérum : La fig. 5 représente graphiquement les variations du taux de lipoprotéines dans le sérum en fonction du temps écoulé pour le groupe des animaux ayant reçu l'agent en question et pour le groupe des animaux témoins. Comme le prouve la fig. 5, dans le groupe témoin, le rapport des β -lipoprotéines aux α -lipoprotéines augmente fortement tandis que, pour le groupe des animaux ayant reçu le médicament, le rapport n'augmente que légèrement et atteint une valeur constante après 8 semaines de traitement. Par conséquent, les données prouvent que l'agent antilipémique en question supprime aussi l'accroissement de la formation de lipoprotéines dans le sérum.

C) Lipides dans les viscères (cholestérol du foie)

Comme le montre le Tableau 2 ci-après, la proportion to-

tale de cholestérol dans les viscères et de cholestérol libre dans les viscères des animaux du groupe traité est abaissée à de faibles valeurs, significativement différentes de celles trouvées pour les animaux du groupe témoin.

5

Tableau 2

Groupe	Cholestérol du foie		libre %
	total (mg/g)	libre (mg/g)	
10 témoin	4,57 (\pm 0,890)	1,09 (\pm 0,166)	24,84 (\pm 1,433)
ST-2 *	1,39** (\pm 0,343)	0,47** (\pm 0,068)	38,24** (\pm 2,694)

15

Notes : * L'agent antilipémique faisant l'objet de l'invention

** Il existe une différence significative dans p 0,01 \pm E.N. (E.N. = erreur expérimentale normale)

20

D) Phytostérols contenus dans le sérum et dans le foie

Le taux de cholestérols totaux dans le sérum et dans le foie est mesuré par une analyse colorimétrique dans laquelle un composé possédant un cycle stérol provoque une réaction. Si des phytostérols sont présents dans un échantillon, il se produit une réaction colorée identique à celle observée pour le cholestérol. Par conséquent, lorsque le taux de cholestérols totaux dans le sérum est déterminé après administration de l'agent antilipémique faisant l'objet de l'invention, cette valeur du taux de cholestérols totaux est considérée comme étant la somme des valeurs pour le cholestérol et les phytostérols. Par conséquent, l'utilisation d'une valeur pour les cholestérols totaux n'établit pas un diagnostic correct de la lipémie. Pour déterminer correctement le taux de cholestérol dans chaque échantillon de viscère et de sérum, il est donc nécessaire de déterminer correctement et de retrancher le taux de phytostérols. On peut déterminer le taux de phytostérols par chromatographie gaz/liquide FID en combinaison avec une chromatographie en couche mince.

35

Exemple 8A - Essais sur des animaux de laboratoire.-

Pour ces essais, on utilise quatre groupes de rats blancs.

40

Un premier groupe témoin est nourri avec des aliments exempts de

cholestérol tandis qu'un deuxième groupe témoin est nourri avec des aliments contenant 0,5 % de cholestérol. Un troisième groupe est nourri avec des aliments auxquels on a ajouté du cholestérol et qui contiennent en poids 1,5 % de phytostérols. Les animaux du quatrième groupe sont nourris avec des aliments auxquels on a ajouté du cholestérol et qui contiennent aussi l'agent antilipémique faisant l'objet de l'invention. Ces aliments sont donnés aux animaux des groupes respectifs pendant quatre semaines. A la fin de la période d'essais de quatre semaines, on détermine les valeurs du taux de cholestérol dans le sérum et comme lipides du foie, et les fractions lipidiques des échantillons de sérum et de foie sont analysées par chromatographie gaz/liquide FID en combinaison avec une chromatographie en couche mince. Les résultats d'essais sont indiqués dans le Tableau 3 ci-après. De l'examen de ce Tableau 3, il ressort qu'environ 50 % en poids des cholestérols totaux sont représentés par des phytostérols substitués.

Par conséquent, la valeur obtenue en retranchant le taux de phytostérols à partir du taux de cholestérols totaux est considérée comme étant la valeur réelle du taux de cholestérol pour le sérum et comme lipides du foie. Les données prouvent que, lorsque l'agent antilipémique en question est donné à des rats dans leurs aliments, le taux du cholestérol vrai se trouve très remarquablement abaissé.

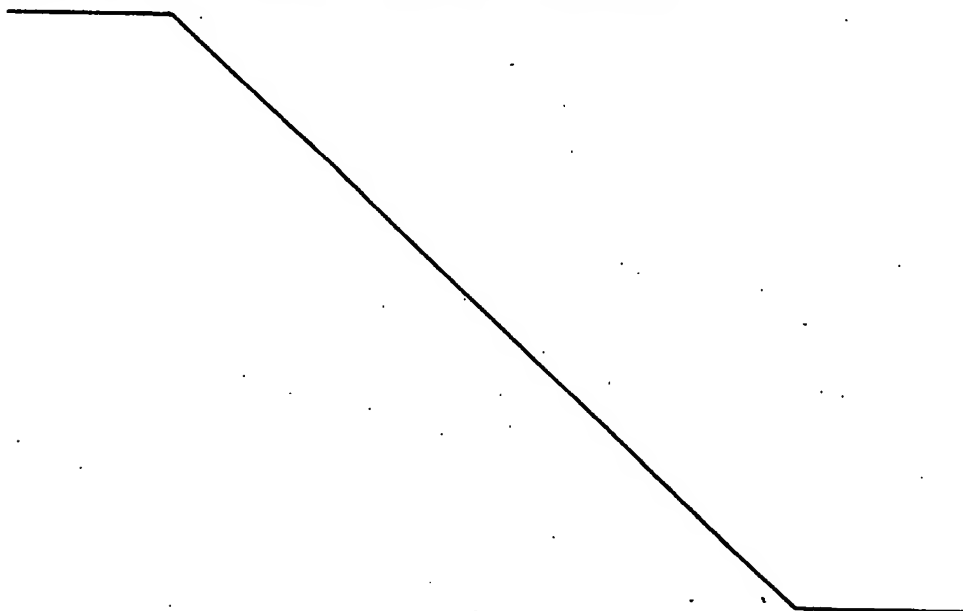


Tableau 3

Composants et taux des stérols dans le sérum (plasma) et dans les lipides du foie de rats nourris avec des aliments contenant des stérols du soja (Exemple 8A).

Groupe	Stérols du sérum (Plasma) en mg/dl				Stérols du foie en mg/g			
	cholé- stérol total	cholé- stérol	stigma stérol	β-sito- stérol	cholé- stérol total	cholé- stérol	stigma stérol	β-sito- stérol
I Aliments sans cholestérols	160	160	-	-	2,8	2,8	-	-
II Aliments contenant en poids 0,5 % de cholestérol	195	195	-	-	60,0	60,0	-	-
III Aliments contenant en poids 1,5 % de frac- tions principalement constituées par des phytostérols	160	87	73		6,4	4,6	1,3	0,5
IV Aliments contenant en poids 1,5 % de l'agent antilipémique selon l'invention	147	81	50	16	5,6	1,7	2,8	1,1

Exemple 8B - Essais cliniques.-

L'agent antilipémique faisant l'objet de l'invention, utilisé dans les essais 8A et 8B et dans les essais cliniques (exemple 9) décrits ci-après, est administré par voie orale sous la
5 forme de capsules, chaque capsule contenant 200 mg de la fraction insaponifiable d'huile de soja.

A) Essais sur des sujets en bonne santé

Pendant six semaines, on donne à chacun des neuf sujets en bonne santé une quantité prédéterminée d'aliments (environ
10 2700 calories par jour) comprenant des viandes à haute teneur en matières grasses (graisses : 40 %). Pendant cet essai, un placebo est donné aux sujets chaque jour pendant la première semaine et, pendant les quatre semaines suivantes, on administre l'agent antilipémique. Pendant la dernière semaine, on administre à nou-
15 veau le placebo. Dans chaque cas, la posologie utilisée est de six capsules par jour. Les valeurs du taux pour le cholestérol total et pour les phytostérols dans le sérum des sujets soumis aux essais sont déterminées respectivement par la méthode de Zak-Henry et par la méthode décrite dans l'exemple 2A ci-dessus.

20 On constate que les phytostérols représentent en poids 10 % du cholestérol total dans le sérum. Ensuite, une semaine après la fin du traitement par l'agent antilipémique en question, on ne peut plus déceler la présence de phytostérols dans le sérum en une proportion quelconque. Les résultats de ces essais sont
25 donnés dans le Tableau 4 ci-après.

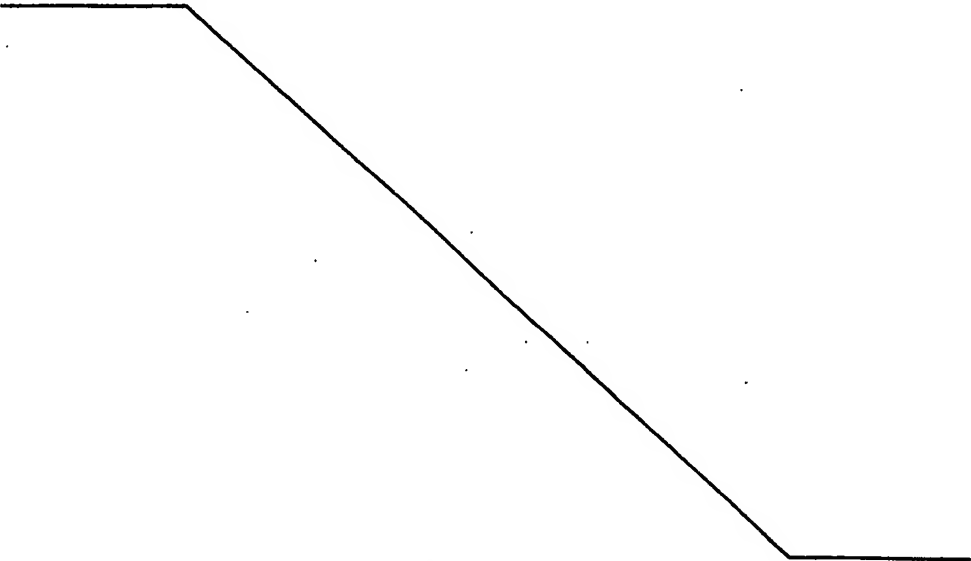


Tableau 4

Modifications apportées parmi les composants biochimiques de lipides du sérum par un placebo et par l'agent antilipémique ST-2

Nature	Composant mesuré en	Valeur avant administration	Placebo Valeur après une semaine	ST-2 **** valeur après			Placebo valeur après une semaine
				une semaine	deux semaines	trois semaines	
GOT	(u)	19	12	9	12	9,6	13,4
GPT	(u)	15	11	6	9	4,2	11,3
ALP	(u)	7,1	5,0	4,8	4,6	5,7	4,5
LDH	(u)	280	200	250	280	260	290
TCH	(mg/dl)	197 [±] 25	228 [±] 36	240 [±] 40	240 [±] 40	240 [±] 29	240 [±] 62
PS*	(mg/dl)	0	0	21	20	24 ^Q	0
Ø -Lip. pro.	(mg/dl)	325 [±] 122	321 [±] 98 ^Q	300 [±] 82	230 [±] 94	246 [±] 106	280 [±] 90
T.T.**	(γ/ml)	6,1 [±] 4,7	7,5 [±] 1,0 [@]	4,8 [±] 3,0	9,2 [±] 3,1	15,3 [±] 4,3 [@]	17,1 [±] 4,6
TBA ***	densité optique	0,058	0,05	0,072	0,068	0,06	0,06

* PS : phytostérol

** T.T. : tocophérol total

*** TBA : valeur de l'acide thiobarbiturique

**** ST-2 : le médicament en question

Q : p < 0,05 @ : p < 0,01 où p représente les limites de certitude

2231394

B) Essai sur des patients

On conduit cet essai sur 45 patients présentant de l'hypertension et ayant des taux de cholestérol total dans les lipides du sérum supérieurs à 220 mg/dl. On administre par voie orale neuf capsules d'un placebo par jour à chaque patient pendant les trois premières semaines d'une période d'essai de six semaines, et on administre neuf capsules de l'agent antilipémique en question (voie orale) par jour pendant les trois dernières semaines. Le cholestérol total sous la forme de lipides du sérum du sang est déterminé par la méthode de Zak-Henry, et les fractions lipidiques du même sérum sont analysées par chromatographie gaz/liquide FID mise en oeuvre en combinaison avec une chromatographie en couche mince. Les résultats sont présentés dans le Tableau 5 ci-après.

De l'examen de ce Tableau 5, il ressort que la valeur du cholestérol total des lipides du sérum se trouve abaissée en moyenne de 13,5 % ($p < 0,05$) à la suite du traitement par l'agent antilipémique selon l'invention, par comparaison avec le témoin traité par un placebo. En outre, si les phytostérols de remplacement, représentant en moyenne 9 %, sont retranchés de la valeur du cholestérol total, la valeur réelle du cholestérol des lipides du sérum devient inférieure de 22,5 % à la valeur correspondante pour le témoin traité par un placebo. Pendant l'administration du placebo, on ne décèle la présence d'aucun phytostérol dans ce sérum.

C) Observation pathologique

a) Observation des viscères

Coeur : on observe des dépôts de graisses dans des portions des coronaires et apex cardiaques des deux groupes, mais le nombre de cas présentant de tels dépôts est plus petit pour le groupe traité par l'agent antilipémique.

Rate : on trouve une substance d'un blanc de lait dans les deux groupes, mais en plus grande quantité dans le groupe témoin.

Foie : sur à peu près tous les sujets du groupe témoin, on trouve un foie gras, cependant que la plupart des sujets du groupe traité par l'agent antilipémique présentent un foie d'une couleur normale.

Tableau 5

Cas no	Nom	Sexe	âge	Avant adminis- tration	Après ad- ministra- tion du placebo		diminu- tion (mg/dl)	phytostérol (%)	Tocophérol total (mg/dl)	Fonctions hépatiques						
					pendant trois semai- nes (mg/dl)	Après ad- ministra- tion du ST-2 pen- dant 3 sem. (mg/dl)				p*	ST-2****	GOT	GPT	ALP	LDH	
1	T.T.	M*	36	225	220	218	-2	0	5	0,5	32	11	8,6			
2	S.T.	M	42	240	245	200	-45	0	3	0,35	16	8	5,6	280		
3	K.K.	M	50	232	270	240	-30	0	20	1,35						
4	T.T.	M	48	238	235	215	-20	0	4	0,45						
5	M.M.	M	59	293	285	230	-55	0	10	0,70	15	8	5,8			
6	T.T.	F***	56	307	310	300	-10	0	25	0,45	74	29	12	560		
7	S.O.	F	45	294	290	220	-70	0	4	0,85	26	44	4	310		
8	N.T.	F	40	271	275	240	-35	0	8	1,90	13	7	3	200		
9	I.Y.	F	52	255	265	250	-15	0	21	1,70	26	29	4,7	130		
10	N.Y.	M	74	290	280	230	-50	0	18	1,70	13	8	4,9	210		
11	H.R.	F	66	277	270	220	-50	0	15	1,70	16	4				
12	K.T.	M	62	198	205	200	-5	0	10	1,20						
13	W.T.	M	19	275	270	250	-20	0	8	1,60	60	13	4,6	300		
14	K.T.	F	78	285	290	240	-50	0	6	1,50						
15	A.K.	M	54	235	250	225	-25	0	0	0,70	10	5	4,5	200		
16	I.K.	M	58	275	260	210	-50	0	7	0,90	64	58	6,7	240		
17	O.S.	M	65	283	275	198	-77	0	5	1,20	30	22	3,5	280		
18	S.K.	F	45	260	275	230	-45	0	3	1,30	25	22	9,9	240		
19	T.S.	M	22	260	268	262	-6	0	20	1,10	38	15	13,3	400		

Tableau 5 (suite)

20	M.S. F	43	235	255	231	-24	0	22	0,80	30	18	5,3	430
21	G.E. F	42	259	257	218	-39	0	15	2,05			3,2	280
22	H.S. M	53	290	288	255	-33	0	28	1,55	126	112	13,3	280
23	K.O. M	59	292	296	270	-26	0	25	1,20	13	9	3,8	220
24	M.K. M	72	302	312	260	-52	0	22	0,90	27	20	0,7	430
25	R.H. M	66	315	305	235	-70	0	0	1,70	15	8	5,2	210
26	S.K. F	69	205	208	208	0	0	4	0,60	18	11	4,3	200
27	R.T. F	66	305	300	310	+10	0	0	0,70	28	38	12,5	130
28	K.K. M	73	289	297	227	-50	0	22	0,75	60	15	11,0	490
29	U.S. F	60	270	272	251	-21	0	21	0,65	32	22	4,3	350
30	T.M. M	67	260	268	240	-28	0	8	1,10	36	16	5,6	320
31	T.S. M	46	265	255	195	-60	0	7	1,35	28	28	7,8	150
32	A.A. F	63	269	265	196	-69	0	0	0,95	70	19	11,0	400
33	G.O. M	49	240	245	187	-58	0	5	1,25				
34	T.I. M	66	276	280	220	-60	0	0	1,60	66	28	12,2	270
35	I.K. M	63	240	235	238	+3	0	8	1,15	33	52	4,3	290
36	I.I. F	58	207	215	200	-15	0	7	0,80	10	15	3,8	200
37	H.A. F	62	220	228	230	+2	0	6	1,90	18	16	2,9	280
38	S.T. M	60	223	219	200	-19	0	2	1,70	35	15	5,3	240
39	T.F. M	71	300	305	220	-85	0	7	0,75	26	22	7,2	230
40	S.S. M	61	305	309	300	-9	0	8	0,95				
41	K.Y. F	55	325	320	295	-25	0	0	1,35	57	48	3,6	450
42	N.T. F	53	290	300	240	-60	0	0	1,15	26	20	6,7	310

Tableau 5 (suite)

43	M.K. M	69	229	225	190	-35	0	0	1,55	14	6	3,1	290
44	S.K. F	57	250	260	190	-70	0	0	1,25	35	22	5,6	390
45	M.M. F	61	266	270	195	-75	0	0	0,80	38	13	6,7	300
valeur moyenne \pm													
écart normalisé													
			265	267	231	-36	0	9,1					
			± 30	± 30	± 31			$\pm 8,5$					
			$p > 0,05$		$p < 0,05$		Rapport						
							abaissé à						
							13,5 %						
			cholestérol total des lipides du sérum										

NOTES

* : Placebo **M : masculin ***F : féminin ****ST-2 : le médicament en question

Aorte : Dans le groupe témoin, le degré d'artériosclérose est le plus grand dans la région de la crosse de l'aorte avec une tendance à un amoindrissement en descendant vers le thorax et la région abdominale. On trouve aussi des dépôts de graisses très nets dans les ouvertures des artères cardiaques, mésentériques et rénales. D'autre part, dans le groupe traité par l'agent antilipémique, on ne trouve ces symptômes que dans deux cas.

b) Modifications du poids des viscères

- En ce qui concerne les reins, les poumons et le coeur, on ne constate aucune différence entre les deux groupes, mais en ce qui concerne le foie, les glandes surrénales et la rate, le poids de ces organes pour le groupe traité par l'agent antilipémique est un peu plus petit que pour le groupe témoin. Une différence significative n'est notée que pour le poids du foie.

c) Examen histologique

On examine histologiquement l'aorte (région de la crosse), le coeur, les poumons, la rate et les glandes surrénales.

- Aorte : dans le groupe témoin, on constate une apparition ou une disparition de cellules de mousse (définies comme étant "des cellules réticuloendothéliales vacuolaires gonflées emplies d'inclusions lipidiques et caractéristiques de certains états impliquant des troubles du métabolisme des lipides"). On trouve en outre des dépôts diffus de graisses sur des portions de la membrane médiane sous la forme de gouttelettes ou d'amas ovales. De plus, on constate dans quelques cas peu nombreux une dégénérescence athéromateuse à l'intérieur de l'aorte qui présente un gonflement et une rupture de fibres élastiques, et la prolifération ou la croissance de fibres ayant la nature d'une colle. Dans quelques cas du groupe témoin, des cellules de mousse coexistent avec un complexe relativement important de graisse au niveau de la couche la plus élevée de la membrane intérieure et avec de fines gouttelettes sur la couche inférieure, indiquant un léger degré d'athérome. Dans les autres cas, il y a soit une absence à peu près complète, soit une légère infiltration de lipides dans les portions endothéliales de la membrane intérieure.

Dans le groupe traité par l'agent antilipémique en question, on ne trouve que dans un seul cas sévère des dépôts granulaires de graisses sur l'endothélium de l'aorte ; des cellules de mousses se trouvent aussi dans ce seul cas. Dans les autres

cas du groupe traité, on ne constate aucun état de ce genre.

poumons : on constate une hypertrophie oedémateuse sur la membrane intérieure des parois artérielles dans deux cas du groupe témoin. On ne constate de tels symptômes dans aucun cas
5 dans le groupe traité.

Coeur : on ne constate dans aucun cas des dépôts de graisse sur les fibres du myocarde, sauf une légère accumulation de graisse sur l'épicaarde dans quelques cas du groupe témoin. des oedèmes de la membrane sur la crosse de l'aorte sont constatés dans 4 cas du groupe témoin, et dans ces cas des symptômes
10 athermateux sont nettement visibles. Dans un cas du groupe traité par l'agent antilipémique en question, on constate un oedème intime, légèrement coloré par l'éosine.

Rate : on constate la présence de dépôts de graisse nichés sous la membrane dans quatre cas du groupe témoin et dans
15 trois cas du groupe traité par l'agent en question, bien que le degré soit différent. Dans les trois cas du groupe traité, on constate une légère hypertrophie de la rate.

Foie : bien que des symptômes de foies très gras soient observés à l'oeil nu, on n'observe en réalité que de petits dépôts de globules gras dans les cellules hépatiques et un dessin de dégénérescence graisseuse (pimélose) circonférentielle. Les dépôts gras sont constatés principalement dans le stroma ou dans les cellules intersticielles et dans les cellules étoilées de
25 Kupffer, plus particulièrement dans le centre et autour du centre de la veine de la capsule de Glisson. Ces symptômes du foie se trouvent, à un degré plus prononcé, dans le groupe témoin, et en général à un degré plus faible dans le groupe traité par l'agent en question.

30 Exemple 9 - Essais cliniques.-

Les essais cliniques suivants ont été conduits au Tokyo Medical College.

Méthode d'essai : 38 patients présentant divers symptômes tels que maladie ischémique du coeur, hypertention, diabète, hépatite aiguë, ulcères gastriques sont soumis aux essais cliniques.
35 Le taux de cholestérol total dans le sérum est compris entre 205 et 335 mg/dl avant traitement et a une valeur moyenne de 260,4 mg/dl. 26 patients présentent un taux de cholestérol total supérieur à 250 mg/dl, et 12 un taux compris entre 205 et 248 mg/dl.
40 Six capsules de l'agent antilipémique faisant l'objet de l'inven-

tion sont administrées chaque jour par voie orale aux patients pendant de 4 à 20 semaines, ou pendant 7,6 semaines en moyenne. A 24 patients, on administre un placebo inactif à la place de l'agent en question au cours de la période comprise entre la 8^{ème} et la 12^{ème} semaine inclusivement.

On obtient ainsi les résultats suivants :

Taux du cholestérol dans le sérum : Le taux moyen du cholestérol dans le sérum avant traitement par l'agent en question est de 260 mg/dl, laquelle valeur se trouve abaissée jusqu'à 225,9 mg/dl deux semaines après le début du traitement et jusqu'à 229,9 mg/dl quatre semaines après. Le taux "rebondit" jusqu'à des valeurs légèrement plus élevées, à savoir 232,2 mg/dl et 240 mg/dl, respectivement 6 semaines et 8 semaines après le début du traitement. Au cours de la 12^{ème} semaine après l'administration du placebo à la place de l'agent pendant 4 semaines, la valeur s'élève jusqu'à 244,8 mg/dl.

β -lipoprotéines : (i) Méthode de Fried Hoeflmayr : la valeur moyenne des β -lipoprotéines est de 592,3 mg/dl avant le commencement du traitement ; 2 semaines après le début du traitement, elle tombe à 527,1 mg/dl ; 4 semaines après, elle est de 529,8 mg/dl ; 6 semaines après, elle est de 535,1 mg/dl ; 8 semaines après, elle est de 550 mg/dl. Par conséquent, la valeur se trouve abaissée pendant la période comprise entre 2 et 6 semaines après le début du traitement. Dans les cas où on utilise un placebo après la 8^{ème} semaine, les valeurs sont de 524,8 mg/dl 10 semaines après, et de 520,7 mg/dl 12 semaines après. Il n'apparaît donc pas de phénomène de rebond.

(ii) Méthode de précipitation capillaire : la valeur moyenne pour 11 cas d'essai est de 4,5 mm avant le début du traitement par l'agent selon l'invention ; elle est abaissée jusqu'à 3,7 mm 4 semaines après le début, et jusqu'à 4,0 mm 8 semaines après. D'autre part, dans cinq cas, lorsque l'agent a été administré pendant 4 semaines puis a été remplacé par un placebo, la valeur moyenne est de 3,7 mm 8 semaines après. Il n'y a donc pas de preuve de l'existence d'un phénomène de rebond.

GOT, GPT : quand on étudie GOT et GPT dans 38 cas, la valeur moyenne de GOT avant traitement est de 31,2 et elle est de 25,1 après traitement ; pour GPT, les valeurs sont de 32,9 et 26,2 respectivement avant et après le traitement.

La valeur de Meulengracht et la valeur d'ALP sont étudiées

dans 38 cas. La moyenne des valeurs de Meulengracht est de 6,9 avant le traitement par l'agent en question et de 6,8 après le traitement ; les valeurs moyennes d'ALP avant et après le traitement sont respectivement de 8,8 et 8,6. Ces valeurs restent
5 relativement constantes avant et après le traitement ; cela prouve que l'agent en question ne produit aucun effet pernicieux.

Action secondaire : on n'observe pas d'effets secondaires.

Exemple 10 - Préparation de la fraction insaponifiable d'huile de soja.-

- 10 Une fraction brute d'acides gras (distillat désodorisé d'huile de soja), contenant en poids environ 25 % de phytostérols et environ 18 % de tocophérols, est admise à réagir avec du méthanol en présence d'acide sulfurique concentré et à une température de 68°C pendant 3 à 4 heures pour former un produit du type ester.
- 15 On chasse le méthanol en excès à partir du produit de réaction, qui est ensuite lavé à l'eau à une température de 170 à 180°C, puis condensé et purifié par distillation moléculaire à une température de 170 à 180°C sous un vide de 20 à 50 mm de Hg. La fraction insaponifiable purifiée d'huile de soja est ensuite ana-
- 20 lysée par un essai de réaction colorée, une méthode de précipitation par la digitonine, les spectres d'absorption dans l'infrarouge et dans l'ultraviolet, et par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse. Les résultats d'essais obtenus sont les suivants :
- | | | |
|----|--|-------------------|
| 25 | phytostérols, y compris campesterol, stigmasterol et
β -sitostérol (en poids) | environ 45 % |
| | tocophérols contenant α -, γ - et
δ -tocophénol (en poids) | environ 20 % |
| | squalène | petite proportion |
- 30 Les tocophérols qui se trouvent dans la fraction insaponifiable sont identifiés comme étant des tocophérols naturels, sur la base des données figurant dans le Tableau 6 ci-après.

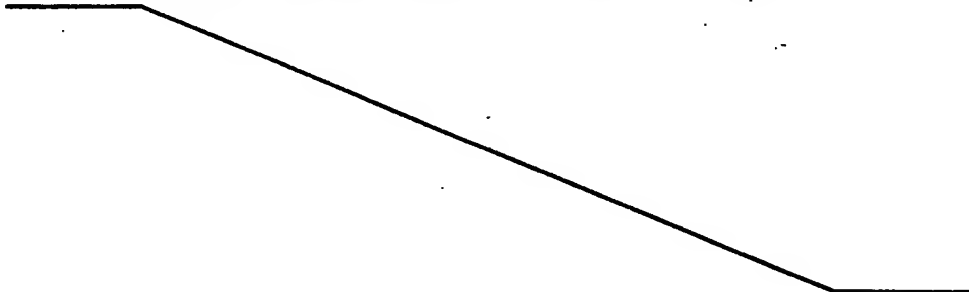


Tableau 6

α -tocophérol V -tocophérol δ -tocophérol			
Réaction colorée	réaction d'Emmerie-Engel	(couleur rouge)	
	réaction de Furter-Meyer	(Couleur brun rougeâtre)	
Essai de chromatographie en couche mince *	(solvant) chloroforme	Rf 0,65 - 0,7	Rf 0,45 - 0,5 Rf 0,25
	(solvant) n-hexène.		
	éther. acide acétique glacial	Rf 0,31	Rf 0,25 Rf 0,18
Spectre d'absorption dans l'ultraviolet (longueur d'onde du maximum d'absorption)	stérol du soja	295 nm	296 - 297 nm 297 - 298 nm
	témoin	290	296 - 297 296 - 297
	8ème Merck Index	294	298 298

* Avec le chloroforme, on trouve encore de faibles taches à Rf 0,98 et 0,92 ; il se confirme qu'il s'agit là de composés analogues aux tocophérols comportant un radical OH phénolique.

Les esters d'acides gras contenus dans la matière insaponifiables sont identifiés à partir des résultats d'essais de chromatographie gaz/liquide : ils comprennent des esters des acides laurique, myristique, palmitique, linoléique et analogues. Les résultats d'essais sont indiqués dans le Tableau 7 ci-après.

Tableau 7

Maximum n°	Durée du temps de rétention (minutes)	Attribution à l'acide :	Maximum n°	Durée du temps de rétention (minutes)	Attribution à l'acide :
10					
PA ₁	50	laurique	PA ₄	280	stéarique
PA ₂	8,9	myristique	PA ₅	31,4	oléique
PA ₃	15,7	palmitique	PA ₆	39,0	linolique

15

La fraction insaponifiable d'huile de soja possède une couleur brunâtre et est un semi-solide opaque à la température ambiante ordinaire. Quand on chauffe cette fraction à une température supérieure à environ 80°C, elle se transforme en un liquide huileux translucide.

20

Pour préparer des granules contenant la fraction insaponifiable d'huile de soja, on opère de la manière décrite ci-après.

La fraction insaponifiable préparée de la manière décrite ci-dessus est généralement utilisée sous la forme de granules conditionnés dans des capsules. Lors de la granulation, il est nécessaire d'utiliser comme absorbant un composé hautement absorbant à l'égard des huiles et qui n'agisse pas défavorablement sur la stabilité des tocophérols contenus dans la fraction insaponifiable. Il convient d'éviter l'utilisation de silicates comme supports car de tels supports peuvent provoquer des troubles hépatiques.

30

Les granules préférées sont ceux qui se désintègrent facilement, ou qui se fragmentent dans l'eau, et dont on peut remplir facilement des capsules dures à l'aide d'un appareillage de remplissage automatique.

35

On a utilisé un anhydride d'acide silicique hautement purifié obtenu par hydrolyse thermique de tétrachlorure de silicium (et vendu dans le commerce sous la marque "AEROSIL N° 200-400") comme absorbant pour préparer l'agent antilipémique administré au cours des essais décrits ci-dessus.

40

L'anhydride d'acide silicique de haute pureté est d'abord ajouté à la fraction insaponifiable d'huile de soja et est bien mélangé avec cette fraction, après quoi on sèche le mélange. Le produit résultant est ensuite pulvérisé. A cette poudre, on peut

- 5 ajouter un solvant organique tel que du chloroforme, du chlorothène, du chlorure de méthylène ou analogue et pétrir le mélange avec la poudre qui absorbe le solvant pour produire des granules possédant des propriétés adéquates en vue du remplissage de capsules à l'aide d'un appareillage automatique approprié.
- 10 Lors de la préparation de granules décrite ci-dessus, il est préférable d'utiliser, conjointement avec le solvant organique, un agent liant soluble dans ledit solvant et tel que de la polyvinylpyrrolidone, un copolymère d'acide 2-méthyl-5-vinylpyridine-méthacrylique, de l'acrylate de méthyle ou analogue, pour améliorer
- 15 la résistance mécanique des granules obtenus et la qualité des comprimés préparés à partir de tels granules. Pour améliorer encore la solubilité du produit dans l'eau, on peut ajouter au mélange une petite proportion d'un agent tensio-actif tel que laurylsulfate de sodium, monostéarate de polyoxyéthylène, polysorbate, ou un dérivé d'huile de ricin ou de polyoxyéthylène ;
- 20 on peut d'ailleurs utiliser un mélange d'au moins deux tels agents tensio-actifs. De plus, pour stabiliser les tocophérols dans la fraction insaponifiable, on peut ajouter une petite proportion d'antioxydants et d'agents synergiques pour antioxydants
- 25 tels que vitamine C, acide citrique, etc.

Les granules ainsi produits contiennent en poids environ 50 % de la fraction insaponifiable d'huile de soja. Il sont convenablement désintégrés par l'eau, et ils offrent comme autre avantage une excellente stabilité des tocophérols qui y sont présents ; ils ne produisent pas de troubles des reins.

Exemple 11.-

- On mesure, et on mélange suffisamment pour former une suspension, 470 g de la fraction insaponifiable d'huile de soja, 20 g de vitamine C, 10 g d'acide citrique, 40g de cellulose-glycolate de calcium, 20 g de laurylsulfate de sodium, 10 g de monostéarate de polyoxyéthylène et 600 ml d'un solvant du type hydrocarbure halogéné. On ajoute 390 g d'"AEROSIL N° 200-400" que l'on mélange avec la suspension tout en agitant. On sèche ensuite le mélange à une température d'environ 50 à 60°C ; on obtient
- 35
- 40 ainsi une matière solide que l'on pulvérise. A la poudre, on

ajoute 600 ml d'une solution, dans un mélange de chlorothène et d'éthanol, contenant 40 g de polyvinylpyrrolidone. On pétrit le mélange résultant, puis on le granule en utilisant un pastilleur ECK. Les granules résultants sont ensuite séchés à environ 50°C ;

5 on obtient ainsi un produit non collant. La teneur en fraction insaponifiable d'huile de soja dans le produit granulé est de 47 % en poids. Les granules se désintègrent facilement dans l'eau. De plus, la stabilité des tocophérols dans le produit granulé est excellente.

10 Une petite proportion d'un lubrifiant tel que du stéarate de magnésium peut facultativement être ajoutée au produit granulé pour faciliter le remplissage de capsules à l'aide de machines automatiques classiques à remplir des capsules.

15 Comme il va de soi, et comme il résulte d'ailleurs déjà de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes d'application et de réalisation qui ont été plus spécialement envisagés ; elle embrasse, au contraire toutes les variantes.

REVENDICATIONS

1. Composition antilipémique c o m p r e n a n t
une fraction insaponifiable d'huile de soja en une proportion suffisante pour abaisser la teneur en lipides du sérum du
5 sang, ladite fraction insaponifiable renfermant environ 45 % en poids de phytostérols et environ 20 % en poids de tocophérols.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits phytostérols sont choisis parmi campestérol, stigmas-
térrol, β -sitostérol et des mélanges d'au moins deux telles subs-
10 tances.
3. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un véhicule pharmaceutique pouvant être administré par voie orale.
4. Composition selon la revendication 3, caractérisée en ce
15 que ledit véhicule pharmaceutique est un anhydride d'acide silicique.

FIG. 1

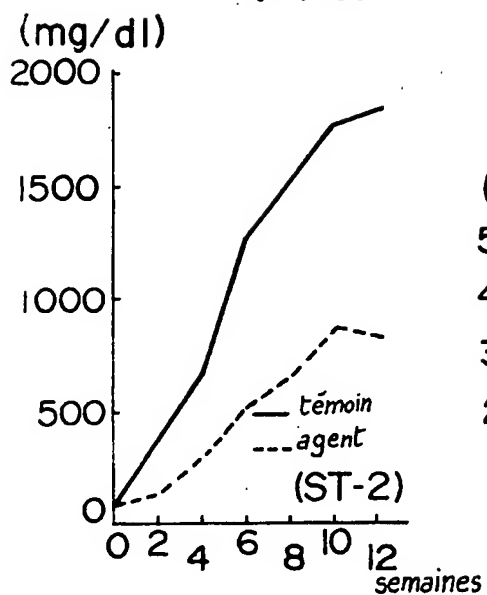


FIG. 2

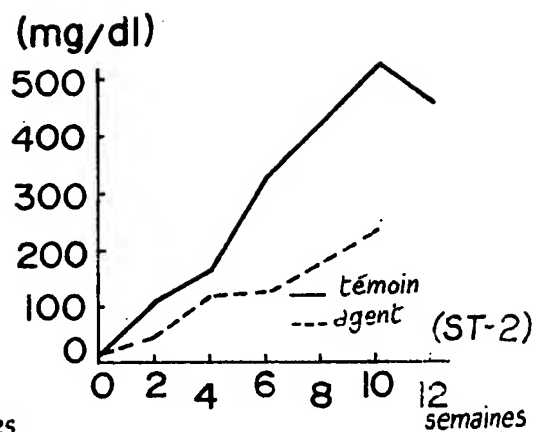


FIG. 3

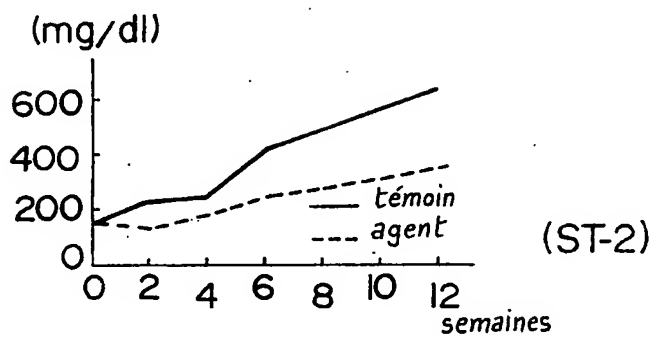


FIG. 4

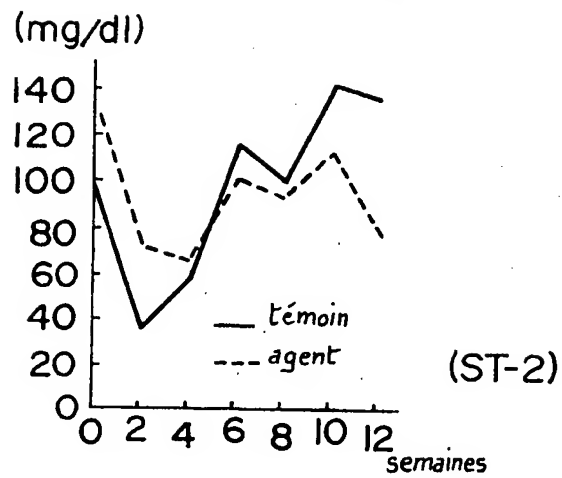


FIG. 5

